

Small Maf 結合因子の酸素濃度変化に対する応答機構

今岡研究室 森本 陽香

【研究目的】 脳梗塞や心筋梗塞において組織は低酸素状態に陥り、治療によって血流が再開すると、酸素濃度が急激に回復することにより細胞は酸化ストレス状態に陥る。これを虚血・再灌流傷害という。しかし傷害が起こった際に、抗酸化因子であるヘムオキシゲナーゼ・1 (HO-1) が十分量誘導されればストレスによる損傷を防ぐことができ、酸化ストレスによる細胞損傷を防ぐうえで HO-1 は大きな役割を果たしている。酸化ストレスにおける HO-1 の発現誘導は Nrf2 と small Maf のヘテロダイマーによって調節されていることが明らかとなっている。また先行研究によってこの small Maf の1つである MafG と低酸素応答で重要な役割を果たしている Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) と相互作用する事が明らかとなった。従って、細胞の酸素濃度変化に対する応答には MafG を通して一連の繋がりがあると考えられる。そこで本研究では、Nrf2 を中心とした酸化ストレス応答系と HIF-1 α を中心として低酸素応答系が MafG を介してお互いに影響し合っているのではないかと考え、その機構を明らかにすることを目的としている。

【実験方法】 Hep3B 細胞を低酸素処理 (1.0%O₂、5.0%CO₂、6 時間培養) して Nrf2 タンパク質発現量を検討した。また Nrf2 の E3 リガーゼである Keap1 との相互作用部位、Neh2 ドメインを欠損した Nrf2 のコンストラクトを作製し、細胞にトランスフェクトして低酸素下での挙動を検討した。さらに Hep3B 細胞を用いて Nrf2 ノックダウン細胞および過剰発現細胞を構築した。得られたクローン細胞を低酸素処理や再酸素化した後に、低酸素マーカーである EPO の発現量変化を調べた。さらにウェスタンブロット法で HIF-1 α 、Nrf2 のタンパク質発現量変化について検討した。Nrf2 過剰発現が細胞に与える影響を検討するため、活性酸素(ROS)量、ミトコンドリアの酵素活性を測定した。ROS の影響を検討するために NAC(N-acetyl-L-cysteine)処理を行った。

【実験結果】 低酸素下では Nrf2 タンパク質発現量が顕著に減少することがわかった。しかし tBHQ によって Keap1 の働きを阻害したり、Keap1 との相互作用部位を欠損したりしたが Nrf2 は低酸素下で減少した。さらに通常酸素状態で HIF-1 α を安定化させたり、低酸素状態で HIF-1 α を減少させたりしたが、Nrf2 発現量には影響を及ぼさなかった。また Nrf2 をノックダウンすると酸化ストレスマーカーである HO-1 の発現量は減少した。この時、低酸素マーカーの EPO の発現量は増加した。反対に、Nrf2 を過剰発現すると HO-1 の発現量は増加し、EPO の発現量は減少した。ルシフェラーゼレポーターアッセイによって、EPO に対するこれらの応答は低酸素応答配列(HRE)依存的な変化であることがわかった。しかし HIF-1 α の総発現量や核蓄積量には変化がなかった。また Nrf2 過剰発現細胞では MOCK に比べて活性酸素量が増加傾向にあり、ミトコンドリアの酵素活性も上昇していた。NAC 処理によって ROS をトラップしたところ Nrf2 過剰発現細胞での EPO の HRE 活性が MOCK と同程度になった。

【考察】 Nrf2 は低酸素下において顕著に減少することが明らかとなったが、低酸素下における Nrf2 の発現制御は E3 リガーゼである Keap1 や低酸素応答鍵因子である HIF-1 α 以外の因子によって行われている可能性が示唆された。また Nrf2 をノックダウンすると低酸素マーカーである EPO の発現量が増加し、反対に Nrf2 を過剰発現すると EPO mRNA 発現量が減少したことから、酸化ストレス応答の鍵因子である Nrf2 が低酸素応答に影響を与えることが明らかとなった。しかし Nrf2 ノックダウン細胞、過剰発現細胞のどちらにおいても EPO の発現に必要な HIF-1 α の総発現量には変化がなかった。先行研究において、Nrf2 の相互作用因子である MafG が HIF-1 α の核蓄積に関与していると明らかとなったので、Nrf2 過剰発現細胞では低酸素下において HIF-1 α と相互作用する MafG が Nrf2 にトラップされていると考えたが、Nrf2 過剰発現細胞での HIF-1 α の核蓄積量は MOCK と比べても変化していなかった。従って Nrf2 は HIF-1 α の発現量ではなく、転写活性化に影響を与えている可能性が示唆された。